

**Makrochemische Untersuchungen  
über das Vorkommen von Chitin  
bei Mikroorganismen**

---

**Inaugural-Dissertation**

zur

**Erlangung der Doktorwürde**

der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Georg August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von

**Matthias Schmidt**

aus Brakel im Nethegau

**Makrochemische Untersuchungen  
über das Vorkommen von Chitin  
bei Mikroorganismen**

---

**Inaugural-Dissertation**

zur

**Erlangung der Doktorwürde**

der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Georg August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von

**Matthias Schmidt**

aus Brakel im Nethegau

---

G ö t t i n g e n 1 9 3 6

Referent: Prof. Dr. A. Rippel

Tag der mündlichen Prüfung: 8. April 1936

ISBN 978-3-662-37120-6      ISBN 978-3-662-37832-8 (eBook)  
DOI 10.1007/978-3-662-37832-8

Sonderdruck aus „Archiv für Mikrobiologie“, Band 7, Heft 3, 1936

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH

Von den Zellwandstoffen der Mikroorganismen ist das im Tierreich verbreitete Chitin durch eine Reihe von Untersuchungen sichergestellt, und *v. Wettstein* hat versucht, das von ihm mikrochemisch nachgewiesene Chitin, da es einzelnen Gruppen fehlt, als charakteristischen Membranstoff zur systematisch-phylogenetischen Bewertung der Mikroorganismen heranzuziehen. Aus diesem Grunde war es wünschenswert, quantitativ-chemische Untersuchungen über die Verbreitung des Chitins nach systematischen Gesichtspunkten vorzunehmen. Denn die mikrochemischen Methoden *van Wisselingh's* bieten nicht die Gewähr unbedingter Sicherheit, da besonders bei geringem Gehalt an Chitin die Chitosanreaktion mit Jod und Schwefelsäure leicht zu Trugschlüssen führen kann.

In der Zwischenzeit ist eine Reihe von Arbeiten erschienen, die sich mit der Isolierung und chemischen Struktur des Chitins befassen. Neben *Herzog* und *Gonell*, die die Ähnlichkeit des Faserdiagramms des Chitins (*Cantharellus cibarius*, *Boletus edulis*) nachwiesen, haben vor allem *H. Meyer* und *H. Mark* röntgenographisch den Aufbau des Chitins untersucht. Danach bestehen die Hauptvalenzen des Chitins aus glucosidisch miteinander verbundenen, N-Acetylgruppen enthaltenden Glucosaminresten. *Schorigin* und *Semljanskaja* versuchten zur Desaminierung des Chitins die Acetylgruppen abzuspalten und dabei die Destruktion des Chitins möglichst zu vermeiden. Es stellte sich jedoch heraus, daß das Molekül ebenfalls zerstört wurde, daß also die Aminogruppe des Chitins durch die Acetylgruppe gut geschützt ist. Mit Hilfe von Dimethylsulfat und NaOH stellten sie ein Monomethylchitin her. *Schorigin* und *Hait* gelang es ferner noch, durch Acetylieren mit Essigsäureanhydrid und Durchleiten von trockenem HCl-Gas das Chitin vollständig zu acetylieren. Alle diese Methoden, die ein Isolieren des Chitins aus den Mikroorganismen voraussetzen, dienen dazu, den mikrochemischen Nachweis des Chitins zu bestätigen und in zweifelhaften Fällen, die gerade beim mikrochemischen Arbeiten leicht auftreten können, sicheren Aufschluß zu geben.

Im Jahre 1811 erhielt *Braconnot* nach Behandeln mit Alkalien bei Pilzen einen Stoff, den er Fungin nannte. *Fremy* stellte dann den Unterschied zwischen Fungin und Cellulose sicher, während *de Bary* ihn für eine Sonderart der Cellulose (Pilzcellulose) hielt. Das Chitin als Membranstoff bei Pilzen (*Claviceps purpurea*, *Agaricus campestris*) haben zuerst *Gilson* und *Winterstein* richtig erkannt und somit sein Vorkommen im Pflanzenreich erwiesen. Auf Grund seiner mikrochemischen Arbeiten fand *van Wisselingh* Chitin bei

*Mucorineen*, *Empusa Muscae*, *Aspergillus*, *Penicillium* und einigen *Basidiomyceten* (*Ustilagineen*, *Uredineen*). Bei *Bakterien*, *Saccharomyceten*, *Peronosporaceen* und *Saprolegniaceen* fehlte Chitin. v. *Wettstein* hat dann die Befunde von *Wisselingh* und *Petersens* noch weiter ergänzt und ist zu dem Ergebnis gekommen, daß bei *Monoblepharideen* und *Oomyceten* (*Peronosporaceen*, *Pythiaceen*, *Saprolegniaceen*) Cellulose vorkommt. Bei den *Phycomyceten* ist dagegen Chitin in den Gruppen (*Zygomyceten*) vorhanden, wo Cellulose fehlt. *Ascomyceten* und *Basidiomyceten* haben ebenfalls Chitin. Bei *Bakterien* fehlt Chitin, Cellulose tritt selten auf. Durch die Einheitlichkeit im Fehlen von Chitin glaubt v. *Wettstein* in zweifelhaften Fällen die Zugehörigkeit zu *Bakterien* oder *Pilzen* entscheiden zu können. Nur *Viehöver* will bei den von ihm untersuchten *Bakterien* im Gegensatz zu *Wisselingh* und *Wester* (*Coli*, *Staphylococcus* usw.) Chitin gefunden haben.

Makrochemisch wurde Chitingehalt festgestellt von *Scholl* bei *Boletus edulis*, von *Rippel* bei *Lactaria vellerea*, von *Behr* bei *Aspergillus niger* (4 bis 21,2%) und von *Proskuriakow* bei *Agaricus campestris*, *Lactarius volemus*, *Armillaria mellea* (2,8 bis 5,5%). Dagegen ergab der Rückstand von *Polyporus* kein einheitliches Produkt (vorher *Winterstein*). *Rippel* und *Witter* glaubten durch das Fehlen von Chitin bei *Actinomyceten* die nähere Verwandtschaft mit den *Mycobakterien* wahrscheinlich zu machen. Röntgenographisch wies *Gonell* die Ähnlichkeit des tierischen Chitins und des Chitins aus *Pilzen* (*Cantharellus cibarius*, *Boletus edulis*) nach, während der Rückstand von *Bacterium xylinum* das Diagramm der Cellulose zeigte. *Rammelberg* unterwarf tierisches und pflanzliches Chitin einer bakteriellen Zersetzung und wies ihre Ähnlichkeit nach. Durch die Fermente des Hepatopankreassaftes der Weinbergschnecke wird Chitin enzymatisch abgebaut.

Nicht allein der quantitative Nachweis des Chitins bei den einzelnen Organismen war der Grund, weshalb die makrochemische Methode angewandt wurde, sondern auch das Versagen des mikrochemischen Verfahrens bei der Autolyse, was ich an *Mucorineen* feststellen konnte. Bei der Autolyse wird das Chitin, wie schon *Behr* zeigte, besonders stark abgebaut und ist in der geringen zurückbleibenden Menge nicht mehr mit Jod und Schwefelsäure unter dem Mikroskop zu identifizieren, da bei der Autolyse offenbar Stoffe entstehen, die leicht mit Jod reagieren und so zu Trugschlüssen führen können.

### Methodik.

Es wurde die Methode von *Scholl* angewendet, die bei großen Mengen Mycel mit geringem Chitingehalt ein wenig umgearbeitet werden mußte. Zunächst wurde folgender Weg eingeschlagen. Nach dem Trocknen wurde das Mycel im Mörser fein zerrieben und nach dem langwierigen und schonenden Verfahren von *Scholl* zuerst mit Wasser, dann mit 10% NaOH gekocht. Es stellten sich jedoch dabei allerlei Schwierigkeiten, wie Stoßen durch Siedeverzug, verbunden mit Verlusten, ein. Deshalb wurde ein Rührwerk benutzt, das beim Kochen das Ansammeln von Mycelteilchen auf dem Boden des Gefäßes verhindern sollte. Dieser Weg war indessen nicht gangbar, da die Natronlauge zu sehr schäumte.

Besonders langwierig war das Abfiltrieren oder Absaugen an der Pumpe. *Scholl* erwähnt in seiner Arbeit, daß „das Auskochen und Filtrieren von 1000 g

Pilzen auf zwei Saugtrichtern von 18,5 cm Durchmesser einige Wochen dauert“. Das heiße Filtrat lief beim Filtrieren und Absaugen zunächst gut ab, ließ dann aber schnell beim Erkalten nach, weil hierbei die gelösten Stoffe wieder schleimig wurden und die Filterporen verstopften. Mit heißem Wasser ließen sich diese schleimigen Substanzen schlecht wieder in Lösung bringen. Auch feuchtes Mycel, das mit einer Fleischhackmaschine zerkleinert war, ließ sich nach dem Kochen schlecht filtrieren.

Es mußte also ein anderer Weg eingeschlagen werden. Das Mycel wurde nicht wie bisher getrocknet, sondern mit dem Messer grob zerkleinert und soweit wie möglich durch Pressen vom Wasser befreit, dann das Gewicht festgestellt. Zur Trockengewichts-, Aschen-, Eiweiß- und Gesamt-N-Bestimmung wurden 3 bis 5 g dieser abgepreßten Masse getrocknet und daraus das Erntetrockengewicht berechnet. Die feuchte Masse wurde in einem 1-Liter-Kolben mit einer 1 %igen HCl-Lösung versetzt und aus einem Dampftopf, wie er im chemischen Laboratorium benutzt wird, Wasserdampf eingeleitet. Die Salzsäure löst die anorganischen Salze und mazeriert gleichzeitig das Mycel.

Das Verfahren ging ausgezeichnet, zumal man mit *einer* Flamme und *einem* Dampftopf mehrere Gefäße gleichzeitig kochen kann. Nach ein- bis zweistündigem Kochen wurde durch einen hinreichend großen Trichter, am besten einen Heiwassertrichter (damit das Eiweiß nicht mehr ausfllt), filtriert. Das Filtrat läuft sehr schnell ab, da die großen Mycelteilchen das Filter nicht verstopfen. Nach gründlichem Auswaschen mit heißem Wasser wurde drei- bis viermal mit 1 % HCl und 5 bis 10 % NaOH abwechselnd 1 bis 2 Stunden mit dem Dampftopf gekocht. Diese Kochungen werden nochmals wiederholt, bis das Filtrat nur noch schwach gelb gefärbt ist. Nach gründlichem Auswaschen läßt man die Masse mit 1 %iger  $\text{KMnO}_4$ -Lösung über Nacht stehen. Das ausgeschiedene Mangansuperoxyd wird mit 1 % HCl und festem Ammonoxalat, das den Vorgang beschleunigt, in Lösung gebracht.

Die Masse wird nun weiter in einem  $\frac{1}{2}$ -Liter-Kolben, der schräg gestellt und mit einer Klammer an einem Stativ befestigt wird, mit 20 % NaOH versetzt und mit kleiner Flamme auf dem Asbestnetz gekocht. Ein Trichter auf dem Kolben soll eine größere Verdunstung verhindern. Dadurch, daß die Wärme an dem Kolben vorbeistreicht, kommt es in dem Gefäß zu Strömungen; die Flocken werden mitgerissen und können sich somit nicht am Boden des Gefäßes ansammeln. Eine abwechselnde Behandlung mit NaOH, HCl und  $\text{KMnO}_4$  erweist sich als sehr vorteilhaft.

Sind die Flocken rein weiß und ohne jegliche festen Bestandteile, so werden sie nochmals oxydiert und dann mit 20 % NaOH und 1 % HCl gekocht. Diese Behandlung ist nötig, da die schleimigen Massen trotz gründlichen Auswaschens Mn zurückhalten. Mit Alkohol und Äther wurde der Rückstand auf dem Filter von Sterinen und sonstigen löslichen Stoffen befreit. In dem wässerigem Filtrat fielen diese Stoffe wieder weiflockig aus. Hiernach läßt sich das Chitin sehr leicht vom Filter lösen. Es wurde bei 100 bis 110° getrocknet.

Da die Ausbeute an Chitin sehr gering war, wurde zur N-Bestimmung die Mikro-Kjeldahl-Methode von Pregl zu einer Halbmikromethode umgearbeitet. Das Gewicht der zu bestimmenden Substanz betrug hierbei 15 bis 25 mg; die Mikromethode arbeitet mit 3 bis 5 mg, die auf einer Mikrowaage abgewogen werden müssen; eine solche stand aber nicht zur Verfügung. Das Halbmikroverfahren hat sich sehr gut bewährt. Die Apparatur und ebenso das Wgerhrchen blieben dieselben wie beim Mikro-Kjeldahl.

Zur Einstellung des Titers wurde chemisch reines  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  benutzt, dessen N-Gehalt erst durch Makro-Kjeldahl bestimmt wurde. Sämtliche Kölbchen wurden vorher mit Wasserdampf behandelt. 1 ccm HCl oder NaOH entsprach 0,22 mg N. Zum Aufschluß genügten 1 ccm  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , eine Messerspitze  $\text{K}_2\text{SO}_4$  und ein Kriställchen  $\text{CuSO}_4$ . Von Zeit zu Zeit wurde der Titer nachgeprüft. Eiweiß-N wurde nach *Barnstein* in 20 mg Substanz bestimmt. Der Aschegehalt des Mycels und des Chitins wurde nach den üblichen Methoden festgestellt. Verdauungsversuche wurden mit Pepsinsalzsäure nach *König* vorgenommen. Der  $p_{\text{H}}$ -Wert der Nährlösungen wurde mit der Wasserstoff- oder Chinhydronelektrode bestimmt. Die Identifizierung des Chitins wurde auf verschiedene Weise vorgenommen; darüber wird nach Besprechung der Versuche berichtet.

### Vorversuche zur Mycelgewinnung.

Es wurden dazu sieben verschiedene *Mucorineen* untersucht<sup>1</sup>. Da es auf große Mycelmengen ankam, konnten *Erlenmeyer*-Kölbchen nicht benutzt werden. Deshalb wurden Kulturschalen von 5 cm Höhe und 19 cm Durchmesser verwendet; diese gestatten es, leicht große Mycelmengen zu gewinnen. Zeigten die Kulturen ein schlechtes Wachstum, so traten nach einigen Tagen Infektionen ein. Wichtig war es, reichlich mit Sporen überzuimpfen, da dann die ganze Nährlösung innerhalb von 2 Tagen zuwuchs, wobei spätere Infektionen nicht mehr störten, auch nicht mehr in Erscheinung traten.

Über die N-Nahrung und Konzentration der Nährlösung war in der Literatur für meine Zwecke kaum etwas zu finden. Um eine optimale, für alle Pilze brauchbare Nährlösung herauszufinden, wurden Nährlösungen mit organischen und anorganischen N-Salzen und verschiedener Konzentration beimpft.

Auf einem Substrat mit  $\text{KNO}_3$  wuchs *Cunninghamella elegans* anfangs sehr schlecht, zeigte aber nach etwa 10 bis 14 Tagen ein sehr dichtes graues Mycel. Nur *Mucor pusillus* wuchs von Anfang an auf dieser Nährlösung sehr gut.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ohne  $\text{CaCO}_3$  konnten wegen der beim Wachstum frei werdenden Säure nicht als N-Quelle dienen. Bei  $\text{CaCO}_3$ -Zusatz entstand am Boden der Kulturschalen, aber nicht im *Erlenmeyer*-Kolben, eine Schleimschicht von Bakterien. Infolge der schnellen Vermehrung der Bakterien stellten die *Mucorineen* bald das Wachstum ein.

Harnstoff dagegen eignete sich für alle untersuchten *Mucorineen* vorzüglich als N-Quelle. Weitere Versuche mit organischen N-Salzen wurden deshalb nicht mehr angesetzt. Die Kulturschalen dürfen nur in einem Raume beimpft werden, wo nicht mit Erde oder Pilzen (*Aspergillus niger*, *Penicillium* usw.) gearbeitet worden ist. Bei Beachtung

<sup>1</sup> Sie wurden von Herrn Dr. *Zycha*, Botanisches Institut der Forsthochschule Hann.-Münden, freundlichst zur Verfügung gestellt.

aller dieser Maßnahmen kann man mit diesen Kulturschalen große Mengen Pilzmycel gewinnen, ohne Infektionen befürchten zu müssen.

### Hauptversuche.

#### Mucorineen (Tabelle I, S. 248).

##### *Cunninghamella elegans auf physiologisch neutralem Substrat.*

Die Nährlösung, die auch für die anderen *Mucorineen* benutzt wurde, war folgendermaßen zusammengesetzt: 100 g Zucker, 7 g  $\text{K H}_2\text{P O}_4$ , 5 g  $\text{Mg S O}_4$ , 0,5 g Citronensäure ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Fe S O}_4$ ,  $\text{Mn S O}_4$  in Spuren), 10 g Harnstoff (neutral), 33,5 g  $\text{K N O}_3$  (alkalisch), 22 g  $(\text{N H}_4)_2\text{S O}_4$  (sauer) auf 1000 ccm Wasser. Die Citronensäure soll den etwa entstehenden Niederschlag  $\text{Fe}_3(\text{P O}_4)_2$  in Lösung bringen. Im ganzen wurden 4 Liter Nährlösung auf 20 Kulturschalen verteilt und nach dem Sterilisieren beimpft. Wachstum bei 25°. Tabelle I gibt das Mycelgewicht für verschiedene Altersstadien mit dem N-, Eiweiß-N- und Aschen-Gehalt an, ferner die nach der jedesmaligen Behandlung des Mycels übrigbleibende Menge Chitin mit dem N- und Aschen-Gehalt. Da die  $p_{\text{H}}$ -Werte in einzelnen Kulturschalen zu sehr schwankten, wurden zu ihrer Bestimmung Kulturen in 100 ccm *Erlenmeyer*-Kolben angesetzt. Von einer weiteren Untersuchung der Autolyseprodukte (Aminosäure,  $\text{N H}_3$ -N im Substrat) und der Bestimmung des jeweiligen Zuckergehaltes des Substrats wurde Abstand genommen, weil die ganze Verarbeitung der Kulturen zeitlich nicht möglich war und es hier lediglich auf das Schicksal des Chitins ankam.

Das Mycel hatte schon am zweiten Tage eine dünne, weißgraue Decke gebildet; seine Farbe ging mit dem Alter von hell- in dunkelgrau über. Am 82. Tage bildete es eine braune schleimige Masse, die stark in Autolyse übergegangen war. Die Kultur war, wie festgestellt wurde, bakterienfrei. Die Farbe des Substrates war erst gelb und wurde später braun. Schon am 18. Tage war das Mycel leicht in Autolyse übergegangen, was sich in einer Änderung des Chitingehaltes und des  $p_{\text{H}}$ -Wertes bemerkbar macht. Es ist sehr wahrscheinlich, daß das Höchstgewicht etwa am 13. Tage erreicht war. Bei der weiteren Autolyse bis zum 82. Tage weist der Gesamt-N-Gehalt keine großen Veränderungen auf. Eiweiß-N und Chitin sind dagegen stark in Autolyse gegangen.

Nach 165 Tagen ist ungefähr ein Drittel des Mycels in Autolyse gegangen. Nach der Verarbeitung blieb ein schleimiger Rückstand, der sich sehr schlecht mit Alkohol auswaschen ließ. Der hohe N-Gehalt und das Entstehen von drei verschiedenen Salzen (sehr wenig Glucosaminchlorhydrat) nach dem Kochen mit konz.  $\text{HCl}$  deuteten darauf hin, daß kein einheitliches Produkt vorlag, das jedoch nach der vorliegenden Methode nicht reiner herzustellen war.

Bei der Eiweiß-N-Bestimmung wird der Chitin-N mitbestimmt. Es ist dies wohl der einzige Fall, wo ein Nichteiweißkörper als Eiweißkörper mitbestimmt wird, wie es auch *A. Rippel* schon erwähnte. Aus begrifflichen Gründen nahm der Aschengehalt des Mycels infolge



der immer mehr alkalisch werdenden Reaktion des Substrates zu. Es ist allerdings möglich, daß die schleimig werdende Masse die bei der alkalischen Reaktion der Nährlösung entstehenden Kriställchen einschließt (vgl. *M. silvaticus*). Der Aschengehalt des Chitins war ganz von der Verarbeitung abhängig. Beim Chitingehalt muß man berücksichtigen, daß bei dem langwierigen Arbeiten, besonders beim Filtrieren, Verluste eintreten, und zwar bei kleineren Mengen Chitin höhere als bei größeren. Die Werte liegen also alle etwas höher (vgl. S. 248). Vom Stickstoff des Mycels (10 Tage) wurde 30,87% verdaut.

*Cunninghamella elegans auf physiologisch saurem Substrat.*

Bei dem geringen Chitingehalt schienen Versuche mit physiologisch saurem und alkalischem Substrat wünschenswert, da *Behr* bei *Aspergillus niger* nach 170 Tagen 21,2% Chitin bei saurer und 1,04% bei alkalischer Nährlösung fand. Es wurde deshalb 1 Liter Nährlösung  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  auf 25 200 cem-Kolben verteilt, sterilisiert, mit *Cunninghamella elegans* beimpft und bei 23° im Brutzimmer aufgestellt. Nach einigen Tagen befanden sich am Boden des Gefäßes einige Flöckchen Mycel. Später erschienen auch einige Hautinseln auf der Oberfläche der Nährlösung.

Die Ernte am 33. Tage betrug ungefähr ein Fünftel der auf physiologisch neutralem Substrat erzielten. Der mikroskopische Befund des gelblichen Mycels zeigte, daß die Hyphen infolge des immer größer werdenden Säuregehaltes deformiert waren und, wie es *Ritter* auch schon bei anderen Vertretern fand, viele Blasen- und Kugelzellen bildeten. Die Verarbeitung des Mycels war die gleiche wie vorhin. Der ganze Vorgang dauerte jedoch nur 5 Tage, während sonst die Behandlung 3 bis 4 Wochen in Anspruch nahm. Der Chitingehalt ist bedeutend höher als im physiologisch neutralem Substrat. Der Oxalsäurenachweis im Substrat ergab, daß sich im Gegensatz zur Harnstoffkultur viel Oxalsäure gebildet hatte.

*Cunninghamella elegans auf physiologisch alkalischem Substrat.*

Auf physiologisch alkalischem Substrat war für den gleichen Pilz kein größerer Unterschied von dem mit Harnstoff als N-Quelle zu erwarten. Es wurde die äquivalente Menge  $\text{KNO}_3$  genommen. Die Bedingungen waren die gleichen wie vorhin.

Das anfangs feine weißgraue Mycel verdichtete sich zu einer lederartigen Decke. Wie man aus Tabelle I ersieht, liegt bei ungefähr gleichem Myceltrockengewicht der N-Gehalt des Mycels tiefer, der Eiweiß-N-Gehalt dagegen ist der gleiche, während der Chitingehalt etwas höher als auf neutralem Substrat liegt. Oxalsäure war nicht vorhanden.

*Mucor pusillus auf physiologisch alkalischem Substrat.*

Aus seinem Vorkommen in Heuhaufen konnte man schließen, daß dieser Pilz höhere Temperaturen vertragen würde. Versuche bestätigten denn auch, daß er bei 35 bis 40° sehr gut wuchs. 4 Liter Nährlösung mit

$\text{KNO}_3$  wurden auf 20 Kulturschalen verteilt und nach dem Sterilisieren und Beimpfen bei  $38^\circ$  im Brutzimmer aufgestellt. Es wurde nur dreimal geerntet, da der Pilz infolge der hohen Temperatur zu schnell gewachsen war. Das schwarzbraune Mycel war sehr dicht und brüchig. Auf Schrägröhrchen und auf flüssigem Medium war es bei niedriger Temperatur meist graubraun, bei höherer Temperatur mehr schwarzbraun.

Am achten Tage war der Pilz schon ein wenig in Autolyse übergegangen. Im braunen Substrat war Ammoniak und ein wenig Oxalsäure nachzuweisen. Trotz der fortschreitenden Autolyse stieg das Mycelgewicht bis zum 18. Tage um 2,2 g. Das Wachstum überwiegt also noch die Autolyse. Beim Abheben des Schalendeckels machte sich ein starker  $\text{NH}_3$ -Geruch bemerkbar. Infolge der hohen Temperatur gingen diese Umwandlungen viel schneller vonstatten. Dadurch, daß Wachstum und Autolyse nebeneinander herliefen, konnte das Mycelgewicht nicht mehr viel steigen.

Am 82. Tage ist das Mycelgewicht noch weiter zurückgegangen. An der Unterseite fühlt sich das Mycel schleimig an. Der Gesamt-N-Gehalt ist etwas gestiegen, weil mehr N-freie Bestandteile in Autolyse gegangen sind. Ebenfalls ist der Chitingehalt und der  $p_{\text{H}}$ -Wert der gleiche wie am 18. Tage. Das Substrat ist fast schwarz. Der  $\text{NH}_3$ -Geruch war nicht so stark. Oxalsäure wurde in beiden Stadien nicht gefunden. 23,6 % des Mycelstickstoffs (10 Tage) wurden verdaut.

*Absidia glauca* und *A. cylindrospora* auf physiologisch neutralem Substrat.

Während die beiden vorigen Vertreter Temperaturen von  $25^\circ$  bzw.  $40^\circ$  vertrugen, wuchsen *A. glauca* und *A. cylindrospora* am besten bei  $15^\circ$ . Da sie sich im Wachstum, bei der Autolyse und im Ertrag gleich verhielten, sollen sie auch zusammen behandelt werden. Für jede Kultur wurden je 20 Kulturschalen (4 Liter Nährlösung mit Harnstoff) bei  $15^\circ$  im Keller aufgestellt.

Bis zum fünften Tage wuchsen beide Kulturen sehr langsam. Dann ging das Wachstum schneller vonstatten. Das anfangs weiße Mycel wurde allmählich grau und stark faltig. Die Erträge waren doppelt so hoch wie bei den beiden vorigen Vertretern. Infolge der tiefen Wachstumstemperatur trat die Autolyse sehr langsam ein, und zwar im sauren Gebiet. Die saure Reaktion des Substrates wurde durch das starke Auftreten von Oxalsäure hervorgerufen. Nur bei *A. cylindrospora* war das Substrat am 20. Tage schwach alkalisch. Das Mycel, das bei der Autolyse ungefähr die Hälfte an Gewicht verlor, zeigte nicht die schleimige Konsistenz wie bei *M. pusillus* und *C. elegans*.

Der Chitingehalt war verhältnismäßig gering (0,5 bis 1 %). Allerdings treten beim Verarbeiten so großer Mengen Mycel Verluste ein. Wahrscheinlich wird das Chitin bei der Autolyse der älteren Mycelteile sehr schnell angegriffen, während junges Mycel weiter heran-

Tabelle I.

Alter Tage	Mycel					Chitin				pH
	Trocken- gewicht g	N g	N %	Eiweiß- N %	Asche %	Absoluter Gehalt g	Gehalt %	N %	Asche %	
<i>Cunninghamella elegans.</i> 25°. Physiologisch neutral.										6,63
8	16,198	1,061	6,67	5,24	7,30	0,1920	1,28	6,39	1,63	6,60
18	26,997	1,720	6,37	4,84	7,52	0,2929	1,12	6,58	0,52	7,73
82	23,250	1,550	6,71	2,88	10,5	0,0750	0,32	4,80	0,65	7,81
165	15,385	1,430	6,78	2,43	15,4	0,0610	0,39	6,98	1,78	—
<i>Cunninghamella elegans.</i> 23°. Physiologisch sauer.										4,12
33	5,0065	0,367	7,33	4,40	3,98	0,2060	4,12	6,45	0,10	2,59
<i>Cunninghamella elegans.</i> 23°. Physiologisch alkalisch.										5,32
33	23,275	1,173	5,04	4,29	8,92	0,3266	1,40	6,43	1,39	7,92
<i>Mucor pusillus.</i> 38°. Physiologisch alkalisch.										5,32
8	16,178	0,835	5,16	5,05	9,63	0,2315	1,54	5,65	1,55	7,30
18	18,385	0,868	4,72	3,68	13,2	0,1002	0,58	6,30	1,82	8,40
82	14,740	0,771	5,23	3,65	14,1	0,0859	0,58	5,80	2,25	8,40
<i>Absidia cylindrospora.</i> 18°. Physiologisch neutral.										6,63
12	39,960	2,694	6,74	5,27	7,88	0,3050	0,79	6,00	0,97	5,71
20	47,000	3,182	6,77	5,24	12,5	0,4653	0,99	6,07	0,61	7,55
40	27,520	2,000	7,27	5,75	8,53	0,2357	0,88	4,92	0,91	6,25
99	22,700	1,362	6,00	4,44	6,58	0,0623	0,28	2,91	3,85	5,75
<i>Absidia glauca.</i> 18°. Physiologisch neutral.										6,63
12	40,267	2,742	6,81	5,44	5,29	0,1893	0,49	6,51	0,76	6,69
20	46,770	3,119	6,67	5,00	8,33	0,2108	0,46	5,49	1,03	6,28
40	33,560	2,517	7,68	5,60	5,21	0,1390	0,43	5,45	1,64	6,25
99	21,963	1,462	6,66	4,05	9,01	0,0282	0,13	3,99	2,24	5,45
<i>Mortierella.</i> 18°. Physiologisch neutral.										6,63
56	5,1600	0,293	5,67	4,31	5,28	0,0845	1,64	5,36	4,04	7,60
<i>Mucor silvaticus.</i> 18°. Physiologisch neutral.										6,63
37	14,385	0,935	6,50	5,03	5,49	0,1622	1,18	6,02	0,65	—

Die absoluten Zahlen sind auf 1 Liter Nährlösung berechnet.

wächst und deshalb eine größere Menge Chitin enthält. Der Chitin-gehalt ist bei *A. cylindrospora* etwas höher als bei *A. glauca*. Vom 20. bis 40. Tage sind mehr N-freie Substanzen in Autolyse gegangen, da der N-Gehalt noch zugenommen hat. Hieraus ließe sich allerdings die starke Zunahme der Oxalsäure im Substrat erklären. Am 99. Tage ist das Chitin bis auf einen geringen Prozentsatz in Autolyse gegangen. Das anfangs hellgelbe Substrat ist jetzt braun gefärbt und noch saurer geworden. Von *A. glauca* (10 Tage) wurden 14,65 %, von *A. cylindrospora* 26,1 % des Mycelstickstoffs verdaut.

*Mortierella auf physiologisch neutralem Substrat.*

Es wurden noch drei Mucorineen auf Chitin geprüft, die wegen ihres kümmerlichen Wachstums nicht in den Kulturschalen gezüchtet werden konnten. Nach *Bachmann* wächst *Mortierella* nur unter ganz bestimmten Bedingungen. Die Membran enthält nur sehr wenig Chitin, die starren und festen Sporangienträger dagegen eine leicht nachweisbare, größere Menge. Leider war die Zusammensetzung der Nährlösung nicht angegeben. *Behrs* Angaben über Autolyse und Wachstum werden von *Bachmann* bestätigt. In Agarschrägröhrchen füllte das schneeweiße Mycel den ganzen zur Verfügung stehenden Raum aus und wurde sehr fest. Das Überimpfen war sehr schwierig. Während bei den anderen *Mucorineen* die Sporen sich auf der ganzen Oberfläche verteilten, wuchsen hierbei die Hyphen vom übergeimpften Mycel gleichmäßig nach allen Seiten und stellten bald das Wachstum ein.

Erst als vom 5 Monate alten Mycel übergeimpft wurde, wuchsen die Kulturen bedeutend besser. Nach 56 Tagen wurden von 1 Liter Harnstoffnährlösung (25 200 ccm-Kolben) 5,16 g mit 1,64 % Chitin geerntet. Einige mit *Aspergillus niger* infizierte Kulturen<sup>1</sup> zeigten ein gutes Wachstum. Wurde das Mycel durch Schräghalten des Kolbens auf dem Substrat verschoben, so wuchs es nicht weiter und füllte die freie Oberfläche des Substrates nicht wieder aus. Mycel und Substrat zeigten einen charakteristischen Geruch nach faulendem Holz.

*Mucor silvaticus auf physiologisch neutralem Substrat.*

*M. silvaticus*, der auch auf Würzeagar sehr langsam wuchs, bildete in den Kulturschalen eine dünne Schicht Mycel, die sich bei der geringsten Erschütterung zusammenzog und das Wachstum einstellte. Auch durch Zusatz von Erdextrakt wurde kein besseres Wachstum erzielt. 100 ccm-Kölbchen eigneten sich besser; vielleicht bietet der engere Abstand der Glaswand einen besseren Halt.

Die Kulturen zeigten nach 37 Tagen ein sehr verschiedenes Wachstum (33 100-ccm-Kolben mit je 30 ccm Nährlösung).  $p_H$  wurde deshalb nicht gemessen. Unter dem Mycel, das schlecht wuchs, befanden sich Kristalle bis zu 1 cm Durchmesser (Phosphate). Nur dadurch, daß das Substrat allmählich alkalisch wurde ( $NH_3$ ), konnten die Kristalle ein solches Ausmaß erreichen und die Wachstumsschäden hervorrufen.

*Mucor hiemalis.*

Mit diesem Vertreter wurden zahlreiche Versuche unternommen. Die Ausbeute war so gering, daß das Mycel nicht auf Chitin verarbeitet werden konnte. Das schwach gelbliche Mycel wuchs im Substrat als schwammiges Gebilde.

*Allgemeines über Mucorineen.*

Beim Vergleich der einzelnen Ergebnisse findet man hinsichtlich des Wachstums und des physiologischen Verhaltens gewisse Unterschiede. Zunächst haben alle ein verschiedenes Temperaturoptimum.

<sup>1</sup> Diese wurden selbstverständlich nicht mitverarbeitet.

Der Ertrag ist bei hoher Temperatur (*M. pusillus*) wesentlich geringer als bei niedriger (*Absidia*). Dies hat, wie nach *Behr* auch bei *Aspergillus niger*, seinen Grund darin, daß Wachstum und Autolyse verschieden schnell nebeneinander herlaufen. *M. pusillus* und *Cunninghamella* erreichen kein so hohes Mycelgewicht, weil die Autolyse sehr bald nach Beginn des Wachstums infolge der hohen Temperatur weit stärker eintritt als bei *Absidia* in niedriger Temperatur. Bei *Absidia* treten zunächst die hemmenden Faktoren ganz in den Hintergrund. Das Mycel wächst schnell heran, erreicht seine Höchstgrenze und verfällt dann um so schneller der Autolyse (45 % bei *Absidia*, 20 % bei *M. pusillus*, 14 % bei *Cunninghamella*). Der Endertrag wird also durch die Autolyse stark beeinflußt. Infolge der starken Oxalsäurebildung findet bei *Absidia* die Autolyse im schwach sauren Gebiete statt. Das Substrat ist hier viel heller gefärbt als das alkalische bei *M. pusillus* (Huminstoffe).

Der Chitingehalt schwankt bei den einzelnen Vertretern zwischen 0,5 bis 1,6 %, unter Berücksichtigung der Verluste (vgl. S. 248) sind rund 1 bis 2 % vorhanden. Bei *Cunninghamella* wurden auf physiologisch saurem Substrat 4,12 % gefunden. Der Prozentgehalt an Chitin geht auf physiologisch neutralem Substrat bei der Autolyse ganz allmählich herunter, besonders bei niedriger Wachstumstemperatur. Auffallend stark ist dagegen der Abbau des Chitins bei *M. pusillus* am 18. Tage. Hierbei scheint außer der hohen Wachstumstemperatur auch das physiologisch alkalische Substrat eine gewisse Rolle zu spielen. Der starke  $\text{NH}_3$ -Geruch deutet ja auch auf den Abbau N-haltiger Stoffe hin. Auf physiologisch saurem Substrat scheint nur eine schwache Autolyse einzutreten.

Die Verdauung geht nicht dem Chitingehalt parallel, wie man am besten bei *Cunninghamella* (1,2 % Chitin, 30,87 % N verdaut), *A. cylindrospora* (0,8 % Chitin, 26,1 % N verdaut) und *A. glauca* (0,5 % Chitin, 14,65 % N verdaut) sieht.

#### Peronosporaceen.

##### *Pythium de Baryanum* (Tabelle II).

Da *v. Wettstein* bei *Pythium de Baryanum* mikrochemisch kein Chitin nachweisen konnte, wurde der Pilz makrochemisch untersucht<sup>1</sup>. Folgende Nährlösung: 75 g Zucker, 7,5 g Pepton, 15 g  $\text{KNO}_3$ , 3 g  $\text{MgSO}_4$ , 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 1000 ccm Wasser wurde auf 25 200-ccm-Kolben verteilt. Nach 17-tägigem Wachstum bei 25° hatte sich ein submerses schwammiges Mycel gebildet, das nur teilweise aus dem Substrat herausragte.

Die Verarbeitung des Mycels ging sehr gut. Die N-Bestimmung des ziemlich geringen grauen Rückstandes ergab nur 1,60 %, 1,53 %. Nur ein kleiner Teil des Rückstandes könnte also Chitin sein.

<sup>1</sup> Die Reinkultur stammte vom Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn (Holland).

Bei dem Versuch, den Rückstand mit konz. HCl unter Eiskühlung (*Bucherer*) zum Quellen zu bringen, blieben die Teilchen fast unverändert auf der Oberfläche liegen, während Chitin nach etwa einer halben Stunde in den kolloidalen Zustand übergeht. Nach der Schmelze mit KOH (Chitosanschmelze) wurden die Teilchen mit Jod nur schwach braun gefärbt, ließen sich aber nicht in Chitosansulfat überführen.

Chitin fehlt demnach, während bei *Cunninghamella*, wie oben S. 245 erwähnt wurde, in dem, ebenfalls geringen, Rückstand der 165 Tage alten Kultur Chitin nachzuweisen war. Es kann sich also nicht darum handeln, daß mir hier das Chitin entgangen ist.

#### Mycel- und Sproßhefen<sup>1</sup> (Tabelle II, S. 252).

Es wurden drei verschiedene *Mycelhefen* und eine Sporen bildende *Sproßhefe* auf Chitin untersucht.

##### *Endomycopsis capsularis* Schiöningg.

Irgendwelche Angaben über die Chemie der Zellmembranen bei *Mycelhefen* lagen nicht vor. Vorversuche ergaben ein gutes Wachstum auf Würze bei Zimmertemperatur. Zur Mycelgewinnung wurden 48 200-ccm-Kolben mit je 50 ccm Würze (9,15 % Zucker und 0,133 % N) sterilisiert, beimpft und bei 21° im Keller aufgestellt. Nach 25 Tagen hatte sich eine weiße wellige Myceldecke gebildet. Die Würze war dunkelbraun gefärbt.

Das Mycel ließ sich sehr leicht verarbeiten, da die Reagenzien die dünne Mycelschicht leicht angreifen konnten. In ihrem Äußeren glichen die Flocken in der Lösung sehr dem Chitin. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen mit Alkohol und Äther wurde die Masse getrocknet. Da der gelbgraue Rückstand nur 5,95 % N enthielt, wurde er weiter behandelt. Die N-Bestimmung des grauen Rückstandes und die weitere Identifizierung ergab, daß es sich nur um Chitin handeln konnte.

##### *Endomycopsis fibuliger* Lindner.

Das gleiche gilt für *Endomycopsis fibuliger* Lindner. Es wurden 67 100-ccm-Kölbchen mit je 40 ccm Würze angesetzt. Die Kulturen wuchsen langsamer und ergaben auch nicht eine so hohe Ausbeute wie vorhin. Am Boden des Gefäßes bildeten sich anfangs kleine Flöckchen, die nach und nach das ganze Substrat als schwammiges Gebilde ausfüllten. Wachstumsdauer 25 Tage bei 21°. Um das Mycel vom Substrat zu trennen, mußte es abfiltriert werden. Die nähere Untersuchung ergab auch hierbei die Anwesenheit von Chitin.

##### *Eremascus fertilis* Stoppel.

Da *Eremascus* in Würze nur einige Flöckchen am Boden des Gefäßes bildete, wurde versucht, auf Würzeagarschrägröhrchen bessere Erfolge zu erzielen. Es wurden deshalb 15 Röhrchen beimpft und bei 25° im Brutzimmer

<sup>1</sup> Sämtliche Hefekulturen wurden vom Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, bezogen.

30 Tage stehengelassen. Das Mycel wurde vom Agar mit einem Spatel entfernt und getrocknet. War die Ausbeute auch sehr gering, so war der Chitinhalt verhältnismäßig hoch.

Die Identifizierung ergab, daß es sich bei allen drei Vertretern nur um Chitin handeln konnte (siehe unten). Der Chitinhalt ist der gleiche wie bei den *Mucorineen*. Bei *Eremascus* läßt sich der höhere Gehalt an Chitin daraus erklären, daß das Mycel unter aeroben Verhältnissen gewachsen ist, und daß das ältere Mycel auf festem Nährboden lange nicht so schnell in Autolyse übergeht wie in flüssigem Substrat.

*Saccharomyces cerevisiae Marchalianus.*

An Versuchen, die Chemie der Zellmembranen bei *Hefen* aufzuklären, hat es nicht gefehlt. Trotzdem ist es nicht gelungen, ein einigermaßen klares Bild über die Zellwandbestandteile zu bekommen. *Payen*, *Schloßberger*, *Pasteur*, *Nägeli* und *Loew* nennen den Stoff Cellulose oder Hefecellulose (*Czapek*). *Liebermann* und *Bittó* erhielten nach Behandlung der Hefe mit Säure und Alkali ein Präparat von Hefecellulose, das die Chlorzinkjodreaktion gab. *Salkowski* isolierte mit Hilfe makrochemischer Methoden eine Hefecellulose, die mit Jodjodkalium eine braunrote Färbung gab. Nach 20stündigem Erhitzen bei 2,5 Atm. ging die Hälfte in Lösung und zeigte intensive Jodreaktion, der Rückstand dagegen nicht. Er nannte die beiden Stoffe Erythro- und Achroocellulose. *Van Wisselingh* fand mit Hilfe der Jodreaktion kein Chitin in Hefen. *Zander* dagegen hält die Jodreaktion nicht für einheitlich. *Dreyer* rechnet die Hefemembran zu den Hemicellulosen.

Es sollte nun versucht werden, in Sporen bildenden Hefen Chitin nachzuweisen.

Tabelle II.

Alter Tage	Mycel					Chitin				
	Trocken- gewicht g	N g	N %	Eiweiß- N %	Asche %	Absolutes Gewicht g	Gehalt %	N %	Asche %	
<i>Pythium de Baryanum.</i> 25°.										
17	16,507	0,751	4,55	3,70	6,66	0,0930	0,56	1,60	1,96	
<i>Endomycopsis capsularis</i> Schönning. 21°.										
25	27,287	1,408	5,16	4,56	5,50	0,1286	0,47	6,45	0,10	
<i>Endomycopsis fibuliger</i> Lindner. 21°.										
25	10,284	0,6108	5,94	5,05	4,93	0,1450	1,41	6,31	0,35	
<i>Eremascus fertilis</i> Stoppel. 25°.										
30	2,500	—	—	—	—	0,1409	5,64	6,07	1,72	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Marchalianus. 20°.										
6	15,6	0,842	5,49	4,18	4,09	0,0188	0,12	4,34	—	
<i>Oidium lactis.</i> 25°.										
16	4,886	0,1966	4,03	2,51	5,00	0,1491	3,05	6,37	0,62	
<i>Oidium</i> aus Erde. 25°.										
12	14,099	0,857	6,08	4,13	6,34	0,2999	2,13	6,49	1,18	

Zu diesem Zweck wurde *Sacchar. cerevisiae* March. in Würze und Würzeagar von verschiedener Konzentration bei Zimmertemperatur gezüchtet, ohne jedoch einen hinreichenden Prozentgehalt an Hefen mit Sporen zu bekommen. Auch die verschiedenen Angaben in der Literatur beweisen, daß für eine günstige Sporenbildung vielerlei zu beachten ist. So hält *Welten* die niedere Konzentration der Nährlösung, *Zikes* die Temperatur, *Ochmann* die N-Ernährung, *Oehlkers* die H-Ionenkonzentration und *Gorodkowa* 0,25 % Glucose für besonders günstig, womit ich jedoch auch keinen Erfolg hatte.

Da auch durch öfteres Überimpfen die Eigenschaft, Sporen zu bilden, verloren gehen soll, wurde von der Stammkultur eine Öse voll auf Röhrchen mit sterilem Wasser übertragen. Um die Hefe unter aeroben Bedingungen wachsen zu lassen, wurde Würzeagar in Petrischalen mit einigen Tropfen „Hefewasser“, das durch Schütteln auf der ganzen Oberfläche verteilt wurde, beimpft. Nach 6 bis 8 Tagen wurde die Hefeschicht vom Agar abgespült und nach dem Absitzenlassen das darüberstehende Wasser abgesaugt. Der letzte Rest Wasser wurde durch ein Ultrafilter entfernt.

Die so gewonnene Hefe wurde getrocknet und im Mörser zermahlen. Auf 210 Schalen kamen 15,7 g Trockengewicht. Nach dem Extrahieren im Soxhlet mit Äther wurde die Hefe wie vorhin behandelt. Die Lauge mußte durch Zentrifugieren entfernt werden. Vor dem Zentrifugieren wurde ungefähr die Hälfte warmes Wasser zugesetzt, da sich sonst die Hefe beim Zentrifugieren nicht absetzte. Zum Schluß wurde mit  $\text{KMnO}_4$  behandelt und mit Alkohol und Äther gewaschen.

Bei den letzten Behandlungen verhielt sich der Rückstand in der Lösung anders wie Chitin. Während sich dieses auf dem Boden des Gefäßes absetzte, sammelte sich jenes an der Oberfläche. Beim Trocknen wurde der Rückstand schwarz. Leider konnte wegen der geringen Menge nur eine N-Bestimmung gemacht werden, die allein keinen sicheren Aufschluß geben kann.

Hiernach ist es erwiesen, daß Mycelhefen Chitin enthalten; bei Sproßhefen ist das jedenfalls noch recht zweifelhaft, zum mindesten aber sind nur äußerst geringe Mengen vorhanden, da der Rückstand nur 0,12 % betrug, von dem nach dem N-Gehalt (4,34 %) nur etwa die Hälfte Chitin sein könnte. Man ist versucht, das Fehlen oder wenigstens fast gänzliche Zurücktreten des Chitins bei Sproßhefen auf die offenbar an ein mehr anaerobes Wachstum in Flüssigkeiten angepaßte Eigenart zurückzuführen. Vielleicht tritt der abbauende Stoffwechsel hier so stark in den Vordergrund, daß, ähnlich wie bei der Autolyse, die innerphysiologischen Bedingungen mehr nach der Seite eines Chitinabbaues als nach der eines Aufbaues gerichtet sind. Will man das Vorkommen von Chitin als systematisches Merkmal bei Hefen verwenden, so kann das nur unter der Annahme geschehen, daß die Mycelhefen mit den anderen Hefen nicht verwandt sind, was hier nicht entschieden werden kann.

Vielleicht gelingt es, bei besserer Sporenbildung und höheren Erträgen Chitin nachzuweisen. Da aber nur bei niederen Konzentra-



tionen Sporenbildung eintreten soll, ist an eine höhere Ausbeute nicht zu denken. Es müssen deshalb andere Wege eingeschlagen werden.

#### Oidium (Tabelle II, S. 252).

##### *Oidium lactis* und *Oidium* aus Erde.

Da man *Oidium* in der Systematik noch nicht recht unterzubringen weiß, scheint eine Prüfung auf Chitin angebracht. Als Versuchsobjekt dienten *Oidium lactis*, der als Schimmelrasen auf der Milch vorkommt, und ein *Oidium* aus Erde. Vorversuche mit  $\text{KNO}_3$  als N-Quelle lieferten ein sehr feines Mycel, mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hatten sich am Boden des Gefäßes kleine braune Flöckchen gebildet. Der mikroskopische Befund ergab, daß die Oidien in der Dicke völlig verschieden waren, aber weniger Blasen- und Kugelzellen bildeten. Mit Harnstoff und Pepton wurde besseres Wachstum erzielt. Aus anfänglich kleinen Inseln bildete sich nach und nach eine schöne weißgraue Decke. Bei Citronensäurezusatz war der Ertrag etwas höher und das Mycel leicht gefaltet. Nach Schnell erzeugt *Oidium* Säure, um sie selbst wieder aufzubrauchen. Hierdurch wird eine alkalische (ammoniakalische) Reaktion des Substrats hervorgerufen. Es entsteht ein deutlicher Kohl- oder Käsegeruch.

Für *Oidium lactis* wurde folgende Nährlösung angesetzt: 90 g Zucker, 8 g Milchzucker, 2 g Citronensäure, 5 g  $\text{MgSO}_4$ , 7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 30 g Pepton auf 1000 ccm Wasser (33 100-ccm-Kolben). Wachstum bei 25°. Nach 18 Tagen wurde das weißgraue Mycel geerntet. Das gelb gefärbte Substrat reagierte schwach alkalisch.

Für *Oidium* aus Erde wurde 1,5 Liter Nährlösung von derselben Zusammensetzung wie vorhin auf 15 Kulturschalen verteilt und bei 25° im Brutzimmer aufgestellt. Nach 12 Tagen wurde ungefähr die doppelte Menge mehr als bei *Oidium lactis* geerntet.

Wie aus Tabelle II zu ersehen ist, hat *Oidium lactis* einen höheren Chitingehalt als *Oidium* aus Erde. Das läßt sich vielleicht aus dem kleineren Durchmesser der Oidien von *Oidium lactis* erklären, wodurch der Anteil der Zellwandsubstanzen höher sein muß. Das Chitin von beiden war grau und verhältnismäßig rein. Wegen des geringen Gehaltes an Eiweiß und alkohol-ätherlöslichen Stoffen war die Gewinnung des Chitins sehr einfach.

#### Bakterien (Tabelle III, S. 255).

##### *Tuberkelbakterien.*

Wie schon eingangs erwähnt, sind die Ansichten über die Chemie der Zellmembranen von Bakterien sehr verschieden. Kein Autor, der die Zellmembranen vieler Bakterien mikrochemisch untersuchte, außer Viehöver, hat Chitin finden können. Viehövers Befunde sind (besonders durch Wettstein) widerlegt worden. In der Zellwand der *Tuberkelbakterien* wollen Ruppel und Helbing auf mikrochemischem Wege Chitin nachgewiesen haben. Ruppel läßt allerdings die Frage offen, ob es sich um Keratin, Chitin oder fibroinähnliche Stoffe handelt. Helbing dagegen glaubt, daß die Säurefestigkeit der *Tuberkelbakterien* auf das Vorkommen von Chitin zurückzuführen sei. Durch den Reichtum an Chitin könne das eigenartige Verhalten gegen Anilinfarben erklärt werden.

Es schien deshalb eine makrochemische Untersuchung angebracht. Für die Versuche wurden 100 g getrocknete *Tuberkelbakterien* (Rückstand aus der Tuberkulinherstellung)<sup>1</sup> zunächst mehrere Stunden im Soxhlet mit Äther extrahiert. Nach dem Abdampfen

Tabelle III. Bakterien.

Gewicht g	Rückstand g	Rückstand %	N-Gehalt %	Asche %
<i>Tuberkelbakterien.</i>				
I. Rückstand.				
100	0,3210	0,32	0,73	—
II. Rückstand.				
—	0,2170	0,22	0,70	2,55
<i>Diphtheriebakterien.</i>				
30	0,010	0,033	0,163	—

des Äthers blieb ein rotbrauner, wachsartiger Rückstand. Die weitere Verarbeitung war dieselbe wie bei *Saccharomyces*. Nach vier- bis fünfmaliger Behandlung mit NaOH und nach der Oxydation mit KMnO<sub>4</sub> blieb ein weißer Rückstand, der in seinem Äußeren nicht dem Pilzchitin entsprach. Wegen des niedrigen N-Gehaltes (0,73 %) wurde der Stoff noch weiter behandelt. Die N-Bestimmung ergab jedoch denselben Wert 0,66 % (0,735 %). Wahrscheinlich handelt es sich um einen Stoff, der sich chemischen Reagenzien gegenüber genau so verhält wie Chitin. Weitere 25 g Substanz wurden 6 Stunden am Rückflußkühler mit konz. HCl gekocht, um auf diesem Wege Glucosaminchlorhydrat zu bekommen. Die braune Lösung wurde abfiltriert, mit Tierkohle behandelt und eingedampft. Der braune sirupähnliche Rest enthielt nur sehr wenige nadelförmige Kristalle.

#### *Diphtheriebazillen.*

Zur makrochemischen Untersuchung der *Diphtheriebakterien* auf Chitin wurden 50 g getrocknete Bakterien<sup>2</sup> benutzt. Hiervon wurden 30 g genau so verarbeitet wie vorhin. Nach dem Abdampfen des Äthers blieb ein gelber, wachsartiger Rest. Zuletzt ging beim Auswaschen mit Alkohol und Äther der größte Teil in Lösung. Die N-Bestimmung des grauen Rückstandes (10 mg) konnte nur einmal ausgeführt werden.

Die Untersuchung ergab, daß in der Zellwand der *Tuberkel-* und *Diphtheriebakterien* kein Chitin enthalten ist. Somit wurden die mikrochemischen Befunde vieler Autoren, die in der Zellwand von Bakterien kein Chitin gefunden hatten, durch die makrochemischen Untersuchungen bestätigt.

<sup>1</sup> Sie wurden von der Firma *Merck*, Darmstadt, freundlichst zur Verfügung gestellt. — <sup>2</sup> Sie wurden von der I.-G. Farbenindustrie A.-G., Abteilung Behringwerke, Marburg, freundlichst zur Verfügung gestellt.

## Basidiomyceten (Tabelle IV, S. 256).

*Polyporus salicinus.*

Wie schon erwähnt, gelang es *Proskuriakow* nicht, unverändertes Chitin aus *Polyporus* zu isolieren. Bei einem Rückstand von 3 bis 5 % erhielt er nur 0,4 bis 1,01 % N. Auch die neueren Untersuchungen von *Norman* und *Peterson* ergaben kein einheitliches Produkt. Sie bekamen aus diesem Gemisch (2,53 % N) bei der Behandlung mit HCl außer Glucosamin noch einen Glucose bildenden Komplex. Durch Schmelzen der Substanz mit KOH bekam *Proskuriakow* Chitosan, das nach der Methode von *Brunswick* die typischen Kristalle ergab. Dennoch glaubt er noch nicht endgültig, daß das Chitosan aus dem Chitin stammt. Eine weitere Untersuchung schien deshalb angebracht.

25 g getrocknete Fruchtkörpermasse (im Freien an Weiden eingesammelt) von *Polyporus salicinus* wurde fein gemahlen und wie vorhin behandelt. Die Verarbeitung war etwas schwieriger als z. B. bei den *Mucorineen*. Es blieb ein grauer Rückstand, der weiter zu Glucosaminchlorhydrat und Tetrabenzoylglucosamin verarbeitet wurde. Der mikroskopische Befund ergab ein einheitliches Produkt. Wahrscheinlich haben *Proskuriakow*, *Peterson* und *Norman* das Mycel nicht lange genug behandelt. Der N-Gehalt des Rückstandes sowie sein Aussehen in der Lösung entsprach ganz dem Chitin.

*Polystictus versicolor.*

Weiter wurden 25 g getrocknete Fruchtkörpermasse (im Freien an Buchen eingesammelt) von *Polystictus versicolor* verarbeitet. Die Ausbeute an Chitin war etwas höher als bei *Polyporus*. Zur Identifizierung des Rückstandes wurden die üblichen Verfahren benutzt.

*Fomes fomentarius.*

Der Chitingehalt wurde an einer Reinkultur untersucht. Folgende Nährlösung wurde angesetzt: 800 ccm H<sub>2</sub>O, 200 ccm Würze, 60 g Zucker, 20 g Pepton, 2 g MgSO<sub>4</sub>, 4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g Citronensäure. 25 200 ccm-Kolben wurden beimpft und bei Zimmertemperatur 10 Tage stehengelassen. Das weiße Mycel wurde zweimal mit NaOH und einmal mit 1 % HCl be-

handelt, hierauf getrocknet, pulverisiert und in konz. HCl bei Eiskühlung (1 Stunde) in Lösung gebracht. Die salzsaure Lösung enthält das gelöste Chitin. Der ungelöste Teil wird durch ein Glaswollefilter abfiltriert. Beim Verdünnen mit Wasser (besser NaOH oder Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) fällt das Chitin wieder aus. Nach

Tabelle IV.

Gewicht g	Rückstand g	Rückstand %	N-Gehalt %	Asche %
<i>Polyporus salicinus.</i>				
25	0,2662	1,06	6,07	2,36
<i>Polystictus versicolor.</i>				
25	0,3712	1,49	6,38	2,00
<i>Fomes fomentarius</i> (10 Tage alt).				
9,1423	0,1278	1,42	5,21	4,97

der Behandlung mit  $\text{KMnO}_4$  wurde der Rest abfiltriert, mit heißem Wasser gewaschen und getrocknet.

Wie der hohe Aschengehalt in Tabelle IV zeigt, ist hierbei eine nochmalige Behandlung mit  $\text{NaOH}$  und  $\text{HCl}$  unbedingt erforderlich (Verfahren siehe unten). Der Prozentgehalt an Chitin entspricht dem der beiden vorigen Vertreter. Es ist also bei hinreichender Behandlung möglich, aus dem Mycel holzbewohnender *Basidiomyceten* reines Chitin zu gewinnen. Allerdings liegt der Chitingehalt etwas niedriger als z. B. bei *Boletus edulis*. Höchstwahrscheinlich ist das Chitin nicht die einzige Gerüstsubstanz, sondern es werden auch noch celluloseähnliche Bestandteile am Aufbau des Gerüsts beteiligt sein.

#### Die Identifizierung des Chitins.

Der größte Teil des Chitins von *Mucorineen* wurde in Glucosaminchlorhydrat übergeführt, und zwar wurden 1,35 g Chitin 6 Stunden am Rückflußkühler mit  $\text{HCl}$  gekocht. Die salzsaure Lösung wurde vom braunschwarzen Rückstand (Huminstoffe) abfiltriert. Der Rückstand wurde einen Tag lang mit heißem Wasser ausgewaschen. Nach dem Eindampfen blieben 0,736 g Glucosaminchlorhydrat übrig. 0,617 g Huminstoffe enthielten nur 0,19 % N, während *May* und *Ward* 2,35 % N im Humin erhielten. Der wechselnde N-Gehalt der Huminstoffe läßt sich nur durch Ad- bzw. Absorption N-haltiger Verbindungen erklären.

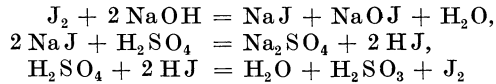
Aus dem Glucosaminchlorhydrat wurde das Pentaacetat und das Tetra-benzoyl-glucosamin hergestellt. Dieses bildet schöne lange Nadeln, die man unter dem Mikroskop leicht erkennen kann. Ebenso wurde das Chitin von *Mycelhefen*, *Basidiomyceten* und *Oidium* verarbeitet. Auffallend gering war der Rückstand (Huminstoffe) bei *Oidium* und *Mycelhefen*.

Nach *Bucherer* kann man das Chitin in konz.  $\text{HCl}$  unter Eiskühlung in Lösung bringen und durch Verdünnen mit Wasser wieder ausfällen. Da er diese Methode zum Reinigen des Chitins benutzte, kann man umgekehrt aber auch den Reinheitsgrad des Chitins prüfen. So ging das Chitin von *Cunninghamella* (6,45 % N) vollständig in Lösung, bei *Eremascus* (6,07 % N) sammelten sich auf der Oberfläche kleine Flöckchen an, die sich als Verunreinigung herausstellten. Sie lösten sich leicht in Alkohol-Äther. Bei noch geringerem N-Gehalt ging sehr wenig in Lösung, während der Rückstand von *Pythium* und den *Tuberkelbakterien* überhaupt nicht mit der Salzsäure reagierte, sondern auf der Oberfläche liegen blieb.

Chitosanverbindungen nach *Brunswik* wurden wegen der geringen Menge Chitin nicht hergestellt. Doch wurden die verschiedenen Rückstände mit 50 %  $\text{KOH}$   $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $140^\circ$  im Autoklaven behandelt und hiernach mit Jod und Schwefelsäure mikrochemisch untersucht. Beim

Chitosan von *Mucor* und *Endomycopsis* wurde Braun- bzw. Violettfärbung, bei *Pythium* eine schwache Gelbfärbung und bei *Tuberkelbakterien* überhaupt keine Färbung erzielt.

Westers Chitin war nur violett gefärbt, wenn es in HCl gelöst und nachher wieder ausgefällt war, während Benecke stets Violettfärbung erhalten hatte. Beneckes Präparate enthielten eben keine Spur NaOH, die von dem gallertigen Chitin leicht zurückgehalten wird. Aus folgenden Reaktionen:



ersieht man, daß alles mögliche eintreten kann, wenn man NaOH nicht entfernt. Die Präparate können sogar auf Zusatz von Jod farblos bleiben, wenn zuviel NaOH zugegen ist. Ist viel Jod und Schwefelsäure vorhanden, so tritt tiefe Violettfärbung ein. Beim Zusatz von wenig Jod und Schwefelsäure bekommt man mehr eine rotviolette Färbung. Auch die Konzentration spielt eine Rolle. Bei den mikrochemischen Reaktionen ist also vielerlei zu beachten, so daß man leicht zu Trugschlüssen kommen kann.

#### Eine bessere Methode zur Chitingewinnung.

Die Tatsache, daß das Chitin sich in konz. HCl unter Eiskühlung auflöst und beim Verdünnen mit Wasser wieder ausfällt, wurde dazu benutzt, das Chitin direkt auf kaltem Wege aus dem Mycel zu gewinnen. Denn das schonende Verfahren von Scholl hat außer der Kostspieligkeit und langwierigen Behandlungsdauer (3 bis 4 Wochen) noch den Nachteil, daß bei dem öfteren Filtrieren Substanz verlorengeht. Dieses wird bei dem neueren Verfahren fast ganz vermieden. Das feuchte Mycel wird nur einmal mit NaOH und HCl behandelt, dann getrocknet und pulverisiert. Dieses Pulver bringt man unter Rühren in eisgekühlte konz. HCl und läßt etwa 1 Stunde stehen.

Hiernach wird durch Glaswolle der ungelöste Teil abfiltriert und mit etwas HCl nachgewaschen. Das Filtrat läßt man in eine NaOH- oder  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung laufen. Nach kurzer Zeit flockt das Chitin rein weiß wieder aus. Durch das entstandene NaCl wird die Ausflockung erheblich beschleunigt. Der größte Teil der Flüssigkeit wird abgehebert und der Rest mit  $\text{KMnO}_4$  über Nacht stehengelassen.

Nach Entfernung des Mangans ist eine nochmalige Behandlung mit NaOH und HCl erforderlich, wie der hohe Aschengehalt des Chitins von *Fomes fomentarius* zeigt. Hierbei wurde nach dem Auflösen des Mangans das Chitin mit heißem Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Als Beispiel wurden je 5 g 3 Wochen altes *Aspergillus*-Mycel benutzt. Nach dem Scholl'schen Verfahren, wie es auch in der Arbeit benutzt wurde, blieben 0,0503 g Chitin, nach der neuen Behandlung 0,0825 g Chitin übrig. Es treten also bei dem öfteren Filtrieren immerhin Verluste ein. Allem Anschein nach läßt sich die langwierige Methode von Scholl durch dieses bedeutend kürzere und billigere Verfahren ersetzen.

### Zusammenfassung.

Es wurden *Mucorineen* (*Cunninghamella elegans*, *Absidia glauca*, *A. cylindrospora*, *Mucor silvaticus*, *M. pusillus*, *M. hiemalis*, *Mortierella*), *Oomyceten* (*Pythium de Baryanum*), holzbewohnende *Basidiomyceten* (*Polyporus salicinus*, *Polystictus versicolor*, *Fomes fomentarius*), *Oidium lactis* und *Oidium* aus Erde, *Mycelhefen* (*Endomycopsis fibuliger* Lindner, *Endomycopsis capsularis* Schönning, *Eremascus fertilis* Stoppel), *Sproßhefen* (*Saccharomyces cerevisiae* Marchalianus), *Tuberkel-* und *Diphtheriebakterien* makrochemisch auf Chitin untersucht.

Der Chitingehalt bei *Mucorineen* in physiologisch neutraler oder alkalischer Nährlösung schwankt zwischen 0,5 bis 1,6%, in saurem Substrat liegt der Wert bei 4%. Die Abnahme des Chitingehaltes und des Mycelgewichtes während der Autolyse ist, abgesehen von der Reaktion des Substrates, abhängig von der Wachstumstemperatur, und zwar ist das Chitin bei höherer Temperatur viel schneller der Autolyse unterworfen als bei niedriger Temperatur. Bei zwei untersuchten Vertretern vollzog sich die Autolyse infolge Ausscheidung von Oxalsäure im schwach sauren Gebiet.

Der Prozentgehalt an Chitin bei den untersuchten *Basidiomyceten* liegt zwischen 1 bis 1,5%. Aus *Polyporus* konnte im Gegensatz zu anderen Autoren ein einheitliches Produkt isoliert werden, das sich genau so verhielt wie das übrige Chitin.

Bei *Oidium lactis* und *Oidium* aus Erde fand sich ein Gehalt von 2 bis 3% Chitin.

*Mycelhefen* (*End. fibuliger* und *End. capsularis*) haben 0,5 bis 1,5% Chitin, während *Eremascus fertilis* auf festem Nährboden sogar 5,6% Chitin lieferte.

In *Sproßhefen* fand sich Chitin nicht oder in so geringer Menge, daß es mit Sicherheit noch nicht identifiziert werden konnte.

Bei *Pythium de Baryanum*, *Diphtherie-* und *Tuberkelbakterien* wurde Chitin nicht gefunden. Die makrochemischen Untersuchungen konnten also die früheren mikrochemischen Befunde, daß *Oomyceten* und *Bakterien* kein Chitin enthalten, bestätigen.

Das langwierige und kostspielige Verfahren von Scholl zur Isolierung von Chitin wurde durch eine bessere und billigere Arbeitsmethode ersetzt.

### Literatur.

Aberhalden, E., Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. 4, 71. Berlin, Urban u. Schwarzenberg, 1912.

Bachmann, H., Centralbl. f. Bakt. 6, 474, 1900. — Baumann, E., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 19, 3220, 1894. — Behr, G., diese Zeitschr. 1, 418, 1930. — Brunswik, H., Biochem. Zeitschr. 113, 111, 1921. — Bucherer, H., Centralbl. f. Bakt. II, 93, 12, 1935.

*Czapek, F.*, Biochemie der Pflanzen **1**, 634, 1913. Jena, G. Fischer, 2. Aufl.

*Dreyer, G.*, Centralbl. f. Bakt. **39**, 123, 1913.

*Emmerling, O.*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 541, 1899.

*Fränkel, S.*, u. *A. Kelly*, Monatsh. f. Chem. **23**, 123, 1912.

*Gilson, E.*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **28**, 821, 1895. — *Gonell, H.*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **152**, 12, 1926. — *Gorodkowa, A.*, Centralbl. f. Bakt. II, **24**, 318, 1909.

*Hoppe-Seyler, F.*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**, 3329, 1894.

*Karrer, P.*, u. *A. Hofmann*, Helv. Chim. Act. **12**, 616, 1929. — *Karrer, P.*, u. *Götz von Francois*, ebenda **12**, 986, 1929. — *Klein, G.*, Handb. d. Pflanzenanalyse **3**, 2. Teil. Wien, Julius Springer, 1932. — *König, J.*, Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe, 3. Aufl. Berlin, P. Parey, 1906. — *Kruse, W.*, Mikrobiologie, S. 69 u. 84. Leipzig, Vogel, 1910. — *Kühnelt, W.*, Biol. Centralbl. **48**, 374, 1928.

*Lafar, F.*, Handb. d. techn. Mykologie **1**, 231, 238. Jena, G. Fischer, 1904—07. — *Liebermann, L.*, u. *B. v. Bittó*, Centralbl. f. Physiol. **7**, 857, 1893.

*May, O.*, u. *G. Ward*, J. Amer. Chem. Soc. **56**, 1597, 1934. — *Meigen, W.*, u. *A. Spreng*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**, 48, 1908. — *Meyer, K. H.*, u. *H. Mark*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **61**, 1936, 1928.

*Norman, A.*, u. *W. Peterson*, Biochem. J. **26**, 1946, 1933.

*Ochmann, W.*, Centralbl. f. Bakt. **86**, 458, 1932. — *Oehlkers, F.*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **41**, 1923, Generalvers. H. D. (31). — *Offer, Th.*, Biochem. Zeitschr. **7**, 117, 1908.

*Pasteur, L.*, C. r. **48**, 640, 1859. — *Pregl, F.*, Die Bestimmung des Stickstoffs nach *Kjeldahl* in kleinen Substanzmengen. Graz 1930. — *Proskuriakow, N.*, Biochem. Zeitschr. **167**, 68, 1926.

*Rammelsberg, G.*, Bot. Arch. **32**, 1, 1931. — *Rippel, A.*, Naturwiss. Zeitschr. f. Forst- u. Landwirtsch. **17**, 142, 1919. — *Rippel, A.*, u. *P. Witter*, diese Zeitschr. **5**, 24, 1934. — *Rippel, K.*, ebenda **2**, 72, 1930. — *Ritter, G.*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **25**, 255, 1907. — *Ruppel, G.*, u. *E. Helbing*, s. *Kruse*, Mikrobiologie.

*Salkowski, E.*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**, 3325, 1894. — *Schlossberger, J.*, Lieb. Annal. **51**, 207, 1844. — *Schnell, E.*, Centralbl. f. Bakt. **35**, 18, 1912. — *Scholl, E.*, Monatsh. f. Chem. **29**, 1023, 1908. — *Schorigin, P.*, u. *N. N. Makarowa-Semljanskaja*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **68**, 965, 1935. — *Schorigin, P.*, u. *E. Hait*, ebenda **68**, 971, 1935.

*Viehöver, A.*, ebenda **30**, 443, 1912.

*Welten, H.*, Centralbl. f. Bakt. **44**, 184, 1916. — *Wester, H.*, Zeitschr. f. Bot. **2**, 210, 510, 1910. — *Wettstein, F. von*, Sitzungsber. d. Akad. Wien **130**, 2, 1921. — *Winterstein, E.*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**, 3113; **28**, 167, 774, 1894. — *Wisselingh, C. van*, Jahrb. f. Bot. **31**, 619, 1898.

*Zikes, H.*, Centralbl. f. Bakt. **49**, 360, 1919.

---

## Lebenslauf

Geboren wurde ich, Matthias Schmidt, am 21. Mai 1910 zu Brakel im Nethegau (Westfalen). Ich besuchte 4 Jahre die Volksschule und 5 Jahre die Rektoratschule meines Heimatortes. Ostern 1930 bestand ich am Gymnasium zu Brilon-Stadt die Reifeprüfung. Hiernach studierte ich 8 Semester an der Universität Münster i. W. Chemie, Physik, Botanik und Landwirtschaft. Am 19. Dezember 1932 bestand ich das erste und am 22. März 1934 das zweite chemische Verbandsexamen.

Die vorliegende Arbeit wurde im landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut der Universität Göttingen vom Juli 1934 bis April 1936 auf Anregung von Herrn Professor Dr. A. Rippel ausgeführt.

Meine Lehrer waren die Herren: Benecke, Bömer, Brinkmann, Ernst, Kaufmann, Kötz, Kühn, Langenbeck, Ley, Mevius, Rippel, Schenck, Schermer, Schmidt, Wagner, Windaus.

Allen meinen Lehrern, ganz besonders Herrn Professor Dr. A. Rippel, der meiner Arbeit stets das größte Interesse entgegenbrachte, bin ich zu aufrichtigem Danke verpflichtet.